

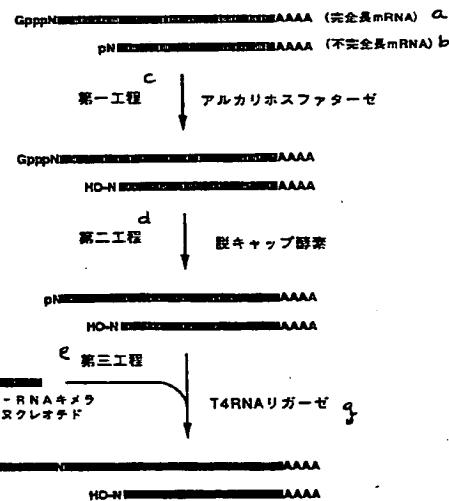
PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 15/10	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/08001
		(43) 国際公開日 1994年4月14日 (14.04.1994)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01359 (22) 国際出願日 1993年9月22日 (22. 09. 93)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平4/280932 1992年9月25日 (25. 09. 92) JP 特願平5/67589 1993年3月3日 (03. 03. 93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 神奈川科学技術アカデミー (THE KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY FOUNDATION) [JP/JP] 〒213 神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 Kanagawa, (JP)</p> <p>(71) 出願人; および (72) 発明者 加藤誠志 (KATO, Seishi) [JP/JP] 〒228 神奈川県相模原市南台1-9-2-304 Kanagawa, (JP) 関根伸吾 (SEKINE, Shingo) [JP/JP] 〒229 神奈川県相模原市西大沼4-4-1 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>		添付公開書類 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。 国際調査報告書
<p>PROCESS FOR SYNTHESIZING COMPLETE-LENGTH cDNA, PROCESS FOR PRODUCING INTERMEDIATE THEREFOR, AND PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT VECTOR CONTAINING COMPLETE-LENGTH cDNA</p> <p>(54) Title : ATE THEREFOR, AND PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT VECTOR CONTAINING COMPLETE-LENGTH cDNA</p> <p>(54) 発明の名称 完全長cDNAの合成方法、その中間体の製造方法及び完全長cDNAを含む組換えベクターの製造方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention discloses a method of providing a cDNA containing the whole of the information on the primary structure of a protein by selectively synthesizing only the complete-length cDNA that contains a sequence beginning with the cap site of a mRNA. The process for producing an intermediate for the synthesis of the complete-length cDNA comprises the step of treating a mRNA extracted from cells with an alkaline phosphatase to eliminate the phosphate group from the 5' end of an uncapped incomplete-length mRNA, the step of decapping from the 5' end of a capped complete-length mRNA, and the step of linking the 5'-end phosphate group formed in the above step to either the DNA oligonucleotide represented by the following general formula (I) or a DNA-RNA chimera oligonucleotide by means of a T4RNA ligase to selectively add the DNA oligonucleotide or DNA-RNA chimera oligonucleotide having an arbitrary sequence to the 5' end of the complete-length mRNA: 5'-dN₁-dN₂-...-dN_m-N₁-N₂-...-N_n-3', wherein dN represents a deoxyribonucleotide selected from among dAMP, dCMP, dGMP and dTMP; N represents a ribonucleotide selected from among AMP, CMP, GMP and UMP; "-" represents a phosphoric ester linkage; m represents an integer of 1 or above; and n represents an integer of 0 or above. The process for synthesizing a complete-length cDNA comprises linking a double-stranded DNA primer having a dT tail by annealing to the poly (A) tail of the 3' end of the complete-length mRNA having the 5' end to which the DNA oligonucleotide or DNA-RNA chimera oligonucleotide have been added as described above, and then synthesizing a single-stranded cDNA complementary to the complete-length mRNA by means of a reverse transcriptase.</p>		

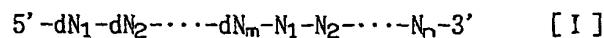
- a ... complete-length
- b ... incomplete-length
- c ... step.1 alkaline phosphatase
- d ... step.2 decapase
- e ... step.3
- f ... DNA-RNA chimera oligonucleotide
- g ... T4RNA ligase



(57) 要約

mRNAのキャップ付加部位から始まる配列を含む完全長cDNAのみを選択的に合成し、蛋白質の一次構造情報を全て含むcDNAを提供する方法が開示されている。本発明は、細胞から抽出したmRNAをアルカリホスファターゼで処理して、キャップがついていない不完全長mRNAの5'末端からリン酸基を除去する工程と、キャップが付いている完全長mRNAの5'末端からキャップを除去する工程と、該工程により生成した5'末端リン酸基に、下記式[I]で表されるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドをT4RNAリガーゼによって連結させ、完全長mRNAの5'末端に選択的に任意の配列を有するDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを付加する工程を含む、完全長cDNAを合成するための中間体の製造方法を提供した。

式 [I]



(ただし、式中、dNはdAMP、dCMP、dGMP、dTTPのいずれかのデオキシリボヌクレオチドを、NはAMP、CMP、GMP、UMPのいずれかのリボヌクレオチドを、-はリン酸エステル結合をそれぞれ表す。mは1以上の整数を、nは0又は1以上の整数を表す。)

また、上記工程により製造された、5'末端に前記DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドが付加された完全長mRNAの3'末端のポリAテールに、dTテールを有する二本鎖DNAプライマーをアニールさせ、次いで逆転写酵素により前記完全長mRNAに相補的な第一鎖cDNAを合成することから成る完全長cDNAの合成方法を提供した。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	CS チェコスロバキア	KR 大韓民国	PL ポーランド
AU オーストラリア	CZ チェコ共和国	KZ カザフスタン	PT ポルトガル
BB バルバードス	DE ドイツ	LI リヒテンシュタイン	RO ルーマニア
BE ベルギー	DK デンマーク	LK スリランカ	RU ロシア連邦
BF ブルキナ・ファソ	ES スペイン	LU ルクセンブルグ	SD スーダン
BG ブルガリア	FI フィンランド	LV ラトヴィア	SE スウェーデン
BA ベナン	FR フランス	MC モナコ	SI スロヴェニア
BR ブラジル	GA ガボン	MG マダガスカル	SK スロバキア共和国
BY ベラルーシ	GB イギリス	ML マリ	SN セネガル
CA カナダ	GN ギニア	MN モンゴル	TG チャード
CF 中央アフリカ共和国	GR ギリシャ	MR モーリタニア	TG チャード
CG コンゴ	HU ハンガリー	MW マラウイ	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	NE ニジェール	US 米国
CI コート・ジボアール	IT イタリー	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CM カメルーン	JP 日本	NO ノルウェー	VN ベトナム
CN 中国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NZ ニュージーランド	

-1-
明細書

完全長cDNAの合成方法、その中間体の製造方法及び完全長cDNAを含む組
換えベクターの製造方法

技術分野

本発明は、mRNAから完全長cDNAを合成する方法に関する。この方法により産業上有用な蛋白質の探索や大量生産が可能となる。

背景技術

細胞が生産している生理活性蛋白質は、医薬、診断薬、バイオセンサー、バイオリアクターなど、産業界で広く利用されている。遺伝子工学技術の進歩により、これらの蛋白質の探索が容易に行なえるようになり、その大量生産も可能になってきた。その基本になっているのがcDNAクローニング技術である。

蛋白質のアミノ酸配列情報は、mRNAにコードされている。従ってmRNAをDNAに置き換えたもの、すなわちcDNA（相補DNA）を合成してやれば、これを元にして蛋白質の一次構造を決めたり、蛋白質の大量生産を行なうことが出来る。そこで細胞からmRNAを抽出した後、これを鋳型にしてcDNAを合成し、この中から目的とする蛋白質をコードするcDNAを取り出すいわゆるcDNAクローニング技術が数多く開発してきた。

cDNAクローニングにおいて最も重要なことはmRNA上にコードされている蛋白質の一次構造情報を全て含むcDNAを合成することである。完全なmRNAは5'末端にキャップと呼ばれる構造を有している。そこでキャップが付加しているヌクレオチドまでを含むcDNAは完全長cDNAと呼ばれている。完全長cDNAが合成できれば、これを用いて蛋白質の全一次構造情報を読み取ることが出来、コードする蛋白質を大量発現することも出来る。従来、キャップ部位までを含んでいなくとも、蛋白質の全コーディング領域さえ含んでいれば、これを完全長cDNAと呼ぶ場合もあったが、本発明ではキャップが付加しているヌクレオチドまでを含むcDNAのみを完全長cDNAと呼ぶことにする。

従来最も広く用いられているGubler-Hoffman法[Gene 25:263-269(1983)]で合成したcDNAは、末端に欠失が起り、完全長cDNAを合成することは出来ない。一方、Okayama-Berg法[Mol.Cell.Biol. 2:161-170(1982)]は、完全長cDNAを効率良

-2-

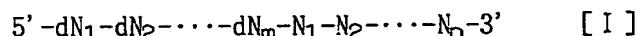
く合成できる方法として知られている。そのポイントは、mRNAを錫型にして第一鎖cDNAを合成した後、cDNAの3'末端にdCテールを付加することにある。しかし、この方法では、第一鎖cDNA合成が途中で停止しているものにもdCテール付加が起こり、得られたものが完全長cDNAであるとは限らない。また分解したmRNAに由来する不完全長cDNAも合成される。

発明の開示

本発明の目的は、mRNAのキャップ付加部位から始まる配列を含む完全長cDNAのみを選択的に合成し、蛋白質の一次構造情報を全て含むcDNAを提供することである。さらにまた、本発明の目的は、この完全長cDNAを合成するための中間体の製造方法及び該完全長cDNAを含む組換えベクターの製造方法を提供することである。

本発明者らは、鋭意研究の結果、キャップを除去した完全長mRNAにDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを付加することにより完全長cDNAを選択的に効率良く合成できることを見いだし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、細胞から抽出したmRNAをアルカリホスファターゼで処理して、キャップがついていない不完全長mRNAの5'末端からリン酸基を除去する工程と、キャップが付いている完全長mRNAの5'末端からキャップを除去する工程と、該工程により生成した5'末端リン酸基に、下記式【I】で表されるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドをT4 RNAリガーゼによって連結させ、完全長mRNAの5'末端に選択的に任意の配列を有するDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを付加する工程を含む、完全長cDNAを合成するための中間体の製造方法



(ただし、式中、dNはdAMP、dCMP、dGMP、dTMPのいずれかのデオキシリボヌクレオチドを、NはAMP、CMP、GMP、UMPのいずれかのリボヌクレオチドを、-はリン酸エステル結合をそれぞれ表す。mは1以上の整数を、nは0又は1以上の整数を表す。)

を提供する。

-3-

さらに、本発明は、上記本発明の方法により製造された、5'末端に前記DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドが付加された完全長mRNAの3'末端のポリAテールに、dTテールを有する二本鎖DNAプライマーをアニールさせ、次いで逆転写酵素により前記完全長mRNAに相補的な第一鎖cDNAを合成することから成る完全長cDNAの合成方法を提供する。

さらに、本発明は、上記本発明のcDNAの合成方法において、前記式[I]で表されるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド配列が、前記DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド中に少なくとも一箇所存在する制限酵素RE1の認識部位を含み、前記二本鎖DNAプライマーが、前記制限酵素RE1の認識部位を少なくとも一箇所有するベクタープライマーであり、該方法により製造された、二本鎖DNAプライマーとmRNA-cDNAハイブリッドの連結体を制限酵素RE1で消化する工程と、該工程の結果物をセルフライゲーションにより環化させる工程と、得られた環化組換えベクター中のRNA部分をDNAに変換する工程をさらに含む、完全長cDNAを含む組換えベクターの製造方法を提供する。

本発明により、従来、困難とされてきた完全長cDNAの合成を確実に行なえるようになった。従って、この方法で作製したcDNAライプラリーからクローニングしたcDNAクローニングは必ず蛋白質の一次構造情報を全て含むことになり、これを利用して直ちに蛋白質を発現させることが可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、キャップのついたmRNAに、選択的にDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを連結させる工程を表す図である。

図2は、合成オリゴヌクレオチドを連結したmRNAを鋳型にして、cDNAを合成する工程を表す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は完全長cDNAを合成する方法に関するものであり、大きく2つの段階からなる。第一段階は、キャップのついたmRNAに、選択的にDNAオリゴヌク

-4-

レオチド又はDNA-RNA キメラオリゴヌクレオチドを連結させることであり、第二段階は、合成オリゴヌクレオチドを連結したmRNAを鑄型にして、cDNAを合成し、該cDNAを含む組換えベクターを合成することである。

第一段階の各工程を図1に示す。なお、第一段階及び第二段階の個々の工程自体は、この分野における常法により行うことができる。

第一工程

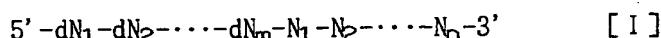
通常、細胞から抽出したmRNAには、キャップ構造を含まない分解産物も含まれている。そこで本工程では、このような分解産物の5'末端から酵素によってリン酸基を除去する。この反応には各種アルカリホスファターゼを用いることが出来る。この工程において、完全長mRNAにはその5'末端にキャップ構造がついているので、アルカリホスファターゼが作用しない。従って、5'末端にキャップ構造を有さない、不完全長mRNAの5'末端のみが選択的に脱リン酸化されて水酸基となる。

第二工程

完全長mRNAから脱キャップ酵素を用いてキャップを除去し、5'末端に1個のリン酸残基を生成する。脱キャップ酵素としては、タバコ由来酸ピロホスファターゼやT4ポリヌクレオチドキナーゼ等を例示出来る。

第三工程

下記式[I]で表されるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを、キャップを除去した完全長mRNAの5'末端リン酸基に、T4RNAリガーゼを用いて連結する。



(ここで、dNは、dAMP、dCMP、dGMP、dTMPのいずれかのデオキシリボヌクレオチドを、Nは、AMP、CMP、GMP、UMPのいずれかのリボヌクレオチドを、-はリン酸エステル結合をそれぞれ表す。mは1以上の整数を、nは0又は1以上の整数を表す。)

後のcDNA含有組換えベクターの作製を容易にするために、デオキシリボヌクレオチド配列の中に制限酵素RE1の認識部位が少なくとも一箇所含まれることが好ましい。制限酵素RE1は、DNA-RNAハイブリッドを切断しないものであれ

-5-

ば何でもよいが、突出末端を生成するものが好ましい。この工程において、完全長RNAの5'末端は第二工程によりリン酸基になっているので前記DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを付加し得るが、不完全長mRNAの5'末端は第一工程により脱リン酸化されて水酸基となっているため、DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドは付加されない。従って、DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドは、完全長mRNAの5'末端にのみ選択的に付加される。なお、T4 RNAリガーゼによる結合は、DNAとRNAとの結合よりもRNAとRNAとの結合の方が一般的に効率が高いので、DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを用いることがより好ましい。

ここで用いられるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドは、化学合成によって容易に合成できる。またDNA/RNA合成機によっても合成できる。なお、DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドは、その合成は容易ではあるが、従来から報告された例はなく、本願発明により初めて提供されたものである。

オリゴヌクレオチドをmRNAに結合する反応においては、オリゴヌクレオチドを、mRNAのモル数に比べ大過剰用いることが望ましい。

第二段階の各工程を図2に示す。

第一工程

第一段階で調製したDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド付きmRNAを、3'末端にn個のdTテールを有する二本鎖DNAプライマーとアニールした後、逆転写酵素により第一鎖cDNAを合成する。プライマーを構成する二本鎖DNAは、オリゴヌクレオチドであっても、任意の二本鎖DNA断片であってもベクタープライマー（例えば、大腸菌の複製オリジンを含むプラスミド由来のDNA）であってもかまわない。オリゴヌクレオチドは、化学合成によって合成できる。この場合、nは10～30個が望ましい。後二者は、プラスミドベクターを、3'突出末端を生成する制限酵素で切断後、末端転移酵素を作用させて、dTテールを付加することにより調製できる。この場合のnは50～70個が望ましい。

-6-

またプライマーを構成する二本鎖DNAは、cDNA含有組換えベクターの合成を容易にするために、dTテールが付加していない方に制限酵素RE2の認識部位を少なくとも1箇所有することが好ましい。RE2はmRNA-cDNAハイブリッドを切斷しないものであれば何でもよいが、突出末端を生成するものが好ましい。オリゴヌクレオチドプライマーやDNA断片プライマーを用いる場合には、RE1とRE2は異なってもよいが、ベクタープライマーを用いる場合には、RE1とRE2は同じである必要がある。

上記第一工程により、完全長mRNAに相補的な第一鎖cDNAの合成は完了する。以下に記載する第二工程ないし第四工程は、合成されたcDNAを含む組換えベクターを調製するための工程である。

第二工程

前記制限酵素RE1及びRE2が存在する場合には、第一鎖cDNAを、制限酵素部位RE1とRE2で切斷することにより、両末端の二本鎖DNA部分に制限酵素切斷末端を生成する。前記制限酵素RE1及びRE2が存在しない場合には、リンカー及びT4DNAリガーゼを用いる常法により、任意の接着末端を生成することができる。なお、制限酵素切斷をせずに平滑末端のまま用いてもよい。

第三工程

得られたcDNA断片を適當な大腸菌用クローニングベクターに挿入する工程であるが、オリゴヌクレオチドプライマーあるいはDNA断片プライマーとベクタープライマーを用いた場合では異なる。オリゴヌクレオチドプライマーあるいはDNA断片プライマーを用いた場合、任意の大腸菌用クローニングベクター（プラスミド、コスミド、ファージ等）を制限酵素RE1とRE2で切斷した後（第二工程でリンカーを用いた場合には、リンカーにより与えられた接着末端に相補的な接着末端を生成する制限酵素でベクターを切斷するか、リンカーを付加して該接着末端を生成する）、第二工程で調製したcDNA断片をライゲーションにより挿入する。一方、ベクタープライマーを用いた場合には、そのままセルフライゲーションを行なう。いずれの場合にも、制限酵素切斷をせずに平滑末端同志のライゲーションを行ってもかまわない。

第四工程

-7-

RNaseH、大腸菌DNAポリメラーゼI、大腸菌DNAリガーゼを添加して、RNA鎖をDNA鎖に置き換える。この操作は常法である。

以上の操作により、完全長mRNAに対して相補的なcDNAを含む組換えベクターが調製される。

完全長cDNAを有するクローンを得る場合には、上記の操作により調製した組換えベクターで、例えば大腸菌のような宿主細胞を形質転換すると、形質転換体から調製したプラスミド、コスミド、ファージ等は、完全長cDNAを有している。以上の工程によって、完全長cDNAを有するクローンを得ることが出来る。

以下、本発明を、実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

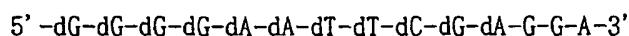
参考例

(1) mRNAの調製

ヒトリボソームホスフォプロテインP1をコードするcDNAクローン（特開平4-117292に記載）から調製したプラスミド5μgをNotI消化した後、これを鋳型にしてペーリンガーマンハイム社製インビトロ転写キットにより、RNAを調製した。この際、 $\text{m}^7\text{G}(5')\text{PPP}(5')\text{G}$ を付属のプロトコール通りに添加して、RNAの5'末端にキャップを付加した。生成物をホルムアミド含有アガロースゲル電気泳動にかけたところ、約600塩基の位置に単一バンドが認められた。これをモデルmRNAとして用いた。このモデルmRNAは、キャップの後にベクター由来の配列、続いてヒトリボソームホスフォプロテインP1 mRNAの配列、最後に約100個のポリAテールを含んでいる。なお、一部のmRNAはキャップを含んでいない。

(2) DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドの合成

下式で表されるオリゴヌクレオチドをDNA合成機（アプライドバイオシステムズ社製、モデル392）を用い、ホスフォアミダイト法により合成した。



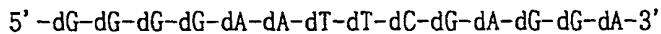
RNA合成試薬は、ペニンスーク社製の物を、DNA合成試薬は、アプライドバイオシステムズ社製の物を用いた。アデニン-CPGカラムをセットした後、2個のリボヌクレオチドGを結合し、次いでデオキシリボヌクレオチドを配列順に結合させ

-8-

た。反応条件は全て付属のプロトコールに従った。最後にオリゴマーをアンモニア-エタノール(3:1)溶液で切り出した後、THF中55°C 10時間処理して保護基をはずした。生成物はポリアクリルアミドゲルで精製した。

(3) DNAオリゴヌクレオチドの合成

下式で表されるDNAオリゴヌクレオチドをDNA合成機(アプライドバイオシステムズ社製、モデル392)を用い、ホスフォアミダイト法により合成した



反応条件は全て付属のプロトコールに従い、生成物は常法によりポリアクリルアミドゲルで精製した。

(4) DNA断片プライマーの調製

約60個のdTテール付加したpKA1ベクタープライマー(特開平4-117292号に記載)100μgを、100単位の制限酵素NdeIで消化した後、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、dTテールを有する約500bpの断片をゲルから切り出して精製した。これをDNA断片プライマーとして用いた。

実施例1

参考例で調製したヒトリボソームホスフォプロテインP1のモデルmRNA 10 μgを、100 mM Tris-HCl(pH 8)に溶解し、RNaseを含まないバクテリア由来アルカリホスファターゼ(宝酒造社製)1単位を添加し、37°C 1時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを50 mM 酢酸ナトリウム(pH 6.0)、1mM EDTA、0.1% β-メルカプトエタノール、0.01% Triton X-100溶液に溶解した。これに、タバコ由来酸ピロホスファターゼ(エビセンターテクノロジーズ社製)1単位を添加して、総量100μlで37°C 1時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを水に溶解した。

脱キヤップ処理したmRNA 15 pmole、参考例で合成したDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド150 pmoleを75 mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.1 mM ATP、10 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレイトール、10 μl DMSO溶液に溶解し、T4RNAリガーゼ

-9-

(宝酒造社製) 100 単位を添加し、総量 100 μ l で 16°C 16 時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを水に溶解した。

DNA-RNA キメラオリゴヌクレオチドを連結した mRNA 3 μ g と約 60 個のdT テール付加した pKAl ベクタープライマー (特開平4-117292に記載) 1.5 μ g を、 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM ジチオスレイトール、 1.25 mM dNTP (dATP+dCTP+dGTP+dTTP) 溶液に溶解し、逆転写酵素 (宝酒造社製) 200 単位を添加し、総量 20 μ l で 42°C 1 時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ジチオスレイトール溶液に溶解した。これに EcoRI (宝酒造社製) 100 単位を添加し、総量 20 μ l で 37°C 1 時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50 μ g/ml 牛血清アルブミン溶液に溶解した。これに大腸菌DNA リガーゼ (宝酒造社製) 60 単位を添加し、16°C 16 時間反応させた。反応液に 2 mM dNTP 2 μ l、大腸菌DNA ポリメラーゼI (宝酒造社製) 4 単位、大腸菌RNaseH (宝酒造社製) 0.1 単位を添加し、12°C 1 時間ついで 22°C 1 時間反応させた。

反応液 10 μ l を大腸菌HB101 のコンピテント細胞 100 μ l と混合した後、常法に従って形質転換を行ない、アンピシリン含有LB寒天培地に蒔いた。生成したコロニーから 12 個を拾い、アンピシリン含有LB培地 3 ml に懸濁した後、一晩培養した。培養液からアルカリリシス法によりプラスミドを単離した。プラスミドを EcoRI と NotI で消化した後、アガロースゲル電気泳動にかけたところ、いずれも約 600 bp のインサートを有していた。それぞれの cDNA 末端の塩基配列をジデオキシ法により決定したところ、いずれも EcoRI の下流に、合成オリゴヌクレオチドに由来する配列と、もとのモデル mRNA のキャップ付加部位から始まる配列を有することが示された。

実施例 2

ウサギグロビン mRNA (B R L 社製) 5 μ g を実施例 1 と同様の方法で脱リソ酸化、次いで脱キャップ処理した。得られた mRNA 30 pmol と参考例で

-10-

合成したDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド3nmolを、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.5mM ATP、5mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、25%ポリエチレングリコール水溶液に溶解し、T4 RNAリガーゼ(宝酒造社製)50単位を添加し、総量30μlで20°C、12時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行い、ペレットを水に溶解した。

反応産物をpKAlベクタープライマーとアニールさせた後、実施例1と同じ条件でcDNA合成及び大腸菌の形質転換を行った。寒天培地上に生成したクロニーから任意に12個拾い、培養後のプラスミドを単離した。ウサギグロビンcDNAはキャップ部位から約400番目にEcoRI部位を有するので、もし完全長cDNAを含んでいるならば、EcoRI消化によって400bpの断片を生成するはずである。単離したプラスミドをEcoRIとNotIで消化した後、アガロースゲル電気泳動にかけたところ、いずれもベクターのバンド以外に、約400bpと約250bpのバンドが見られた。このことからいずれのクローンも完全長cDNAを含んでいると思われる。このことを確認するために各クローンの5'末端の塩基配列を決定したところ、いずれもEcoRI部位の下流に合成オリゴヌクレオチドに由来する配列と、それに続くウサギグロビンmRNAのキャップ部位からの配列を有していた。なお、出発材料として用いたウサギグロビンmRNAはα-グロビンmRNAとβ-グロビンmRNAの混合物である。解析した12クローン中4個がα-グロビンの、残り8個がβ-グロビンの完全長cDNAクローンであった。

実施例3

DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドの代わりに、参考例(3)で調製したDNAオリゴヌクレオチドを用いて実施例と同様の実験を行った。その結果、形質転換体の数は10分の1以下に減少したが、得られた形質転換体からプラスミドを調製し、各クローンの5'末端の塩基配列を決定したところ、いずれもウサギα-グロビンあるいはウサギβ-グロビンの完全長cDNAを含んでいた。

実施例4

実施例2で調製した、DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを連結したウ

-11-

サギグロビンmRNA $3 \mu\text{g}$ を、参考例(4)で調製したDNA断片プライマー $1 \mu\text{g}$ とアニールさせた後、実施例1と同じ条件でcDNA合成を行った。生成物を50単位のEcoR Iと50単位のNot Iで消化した後、プライマーpKA1（特開平4-117292号に記載）のEcoR I、Not I消化物 $1 \mu\text{g}$ とライゲーション反応を行った。反応液で大腸菌の形質転換を行った後、得られた形質転換体からプラスミドを調製した。プラスミドをEcoR IとNot Iで消化した後、アガロースゲル電気泳動にかけたところ、いずれも約400bpと250bpのバンドを生成した。それぞれのcDNA末端の塩基配列をジデオキシ法により決定したところ、いずれもEcoR Iの下流に、合成オリゴヌクレオチドに由来する配列と、ウサギ α -グロビンあるいはウサギ β -グロビンの完全長cDNAを含んでいた。

実施例5

ヒトフィブロサルコーマ細胞株HT-1080から常法を用いて調製したポリ(A) + RNA $10 \mu\text{g}$ を実施例1と同様の方法で脱リン酸化、次いで脱キヤップ処理した。得られたポリ(A) + RNAと参考例で合成したDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド3nmolを、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.5mM ATP、5mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、25%ポリエチレングリコール水溶液に溶解し、T4 RNAリガーゼ（宝酒造社製）50単位を添加し、総量 $30 \mu\text{l}$ で20°C、12時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行い、ペレットを水に溶解した。

反応産物をpKA1ベクタープライマーとアニールさせた後、実施例1と同じ条件でcDNA合成及び大腸菌の形質転換を行った。寒天培地上に生成したコロニーから任意に600個拾い、培養後のプラスミドを単離した。各クローンの5'末端の塩基配列を決定したところ、既知ヒト蛋白質をコードしているものが数多く見出された。これらの中で、ゲノム上で転写開始部位がすでにわかっているものと塩基配列を比較したところ、延長因子1- α 、各種リボソーム蛋白質など豊富に含まれているハウスキーピング蛋白質をコードするcDNAの5'末端配列が転写開始部位の配列と一致した。すなわち、いずれも完全長cDNAである。

-12-

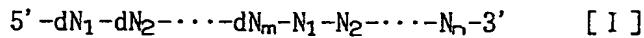
ことが示された。延長因子1- α の場合、得られた10クローンのうち9クローンが完全長cDNA(5' - C T T T T T C G C A A . . . から始まる)を有していた。

産業上の利用可能性

上述のように、本発明により、完全長cDNAの合成を確実に行なえるようになった。従って、この方法で作製したcDNAライブラリーからクローン化したcDNAクローンは必ず蛋白質の一次構造情報を全て含むことになり、これを利用して直ちに蛋白質を発現させることが可能となる。従って、本発明は、遺伝子工学による有用タンパク質の生産に有用である。

-13-
請求の範囲

1. 細胞から抽出したmRNAをアルカリホスファターゼで処理して、キャップがついていない不完全長mRNAの5'末端からリン酸基を除去する工程と、キャップが付いている完全長mRNAの5'末端からキャップを除去する工程と、該工程により生成した5'末端リン酸基に、下記式[I]で表されるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドをT4RNAリガーゼによって連結させ、完全長mRNAの5'末端に選択的に任意の配列を有するDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドを付加する工程を含む、完全長cDNAを合成するための中間体の製造方法。



(ただし、式中、dNはdAMP、dCMP、dGMP、dTMPのいずれかのデオキシリボヌクレオチドを、NはAMP、CMP、GMP、UMPのいずれかのリボヌクレオチドを、-はリン酸エステル結合をそれぞれ表す。mは1以上の整数を、nは0又は1以上の整数を表す。)

2. 前記式[I]で表されるDNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド配列は、後の工程で形成されるmRNA-cDNAハイブリッドを切断しない制限酵素RE1の認識部位を少なくとも一箇所含む請求項1記載の方法。

3. 請求項1記載の方法により製造された、5'末端に前記DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドが付加された完全長mRNAの3'末端のポリAテールに、dTテールを有する二本鎖DNAプライマーをアニールさせ、次いで逆転写酵素により前記完全長mRNAに相補的な第一鎖cDNAを合成することから成る完全長cDNAの合成方法。

4. 請求項2記載の方法により製造された、5'末端に前記DNAオリゴヌクレオチド又はDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドが付加された完全長mRNAの3'末端のポリAテールに、dTテールを有する二本鎖DNAプライマーをアニールさせ、次いで逆転写酵素により前記完全長mRNAに相補的な第一鎖cDNAを合成することから成る完全長cDNAの合成方法。

5. 請求項4記載の方法において、前記二本鎖DNAプライマーは、前記制限酵

-14-

素 R E 1 の認識部位を少なくとも一箇所有するベクタープライマーであり、該方法により製造された、二本鎖 DNA プライマーと mRNA - c DNA ハイブリッドの連結体を制限酵素 R E 1 で消化する工程と、該工程の結果物をセルフライゲーションにより環化させる工程と、得られた環化組換えベクター中の RNA 部分を DNA に変換する工程をさらに含む、完全長 c DNA を含む組換えベクターの製造方法。

6. 請求項 4 記載の方法において、前記二本鎖 DNA プライマーは、制限酵素 R E 2 の認識部位を少なくとも一箇所有する DNA 断片であり、該方法により製造された、二本鎖 DNA プライマーと mRNA - c DNA ハイブリッドの連結体を制限酵素 R E 1 と R E 2 で消化する工程と、該工程の結果物を、末端に制限酵素 R E 1 と R E 2 の切断部位を有するベクターにライゲーション反応によって組換える工程と、得られた環化組換えベクター中の RNA 部分を DNA に変換する工程をさらに含む、完全長 c DNA を含む組換えベクターの製造方法。

7. DNA - RNA キメラオリゴヌクレオチド。

1/2

図面

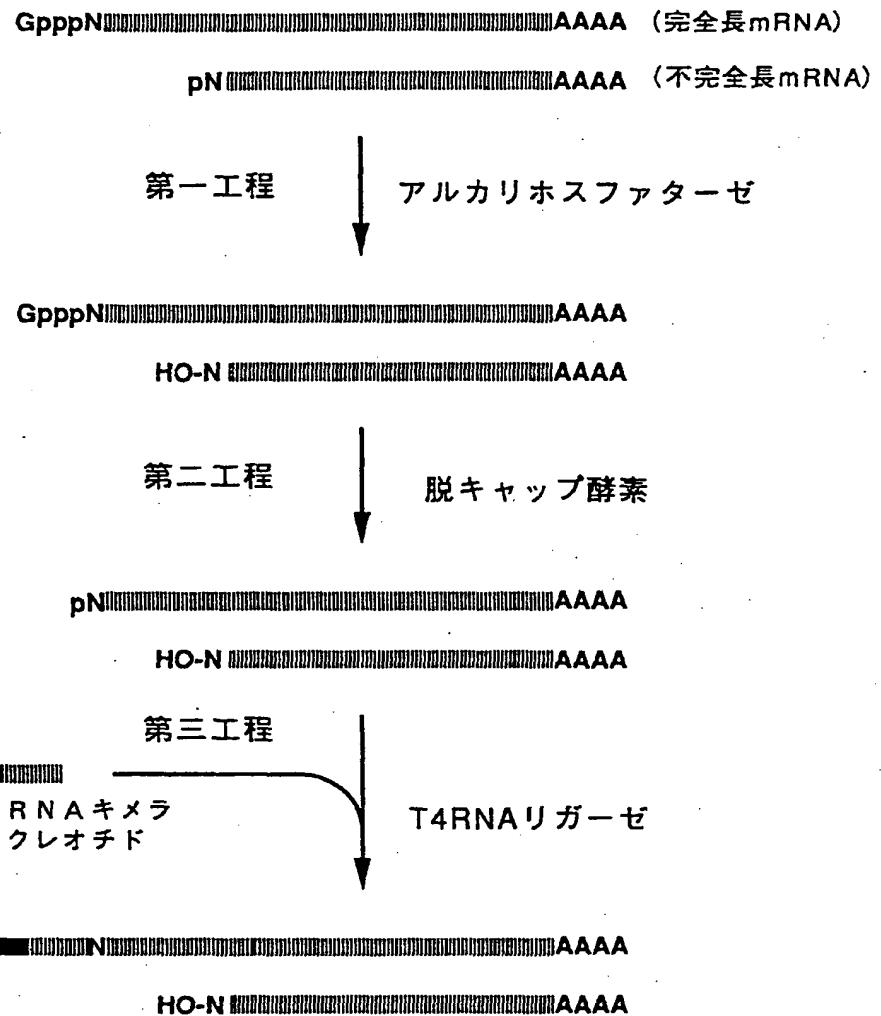


図1

2/2

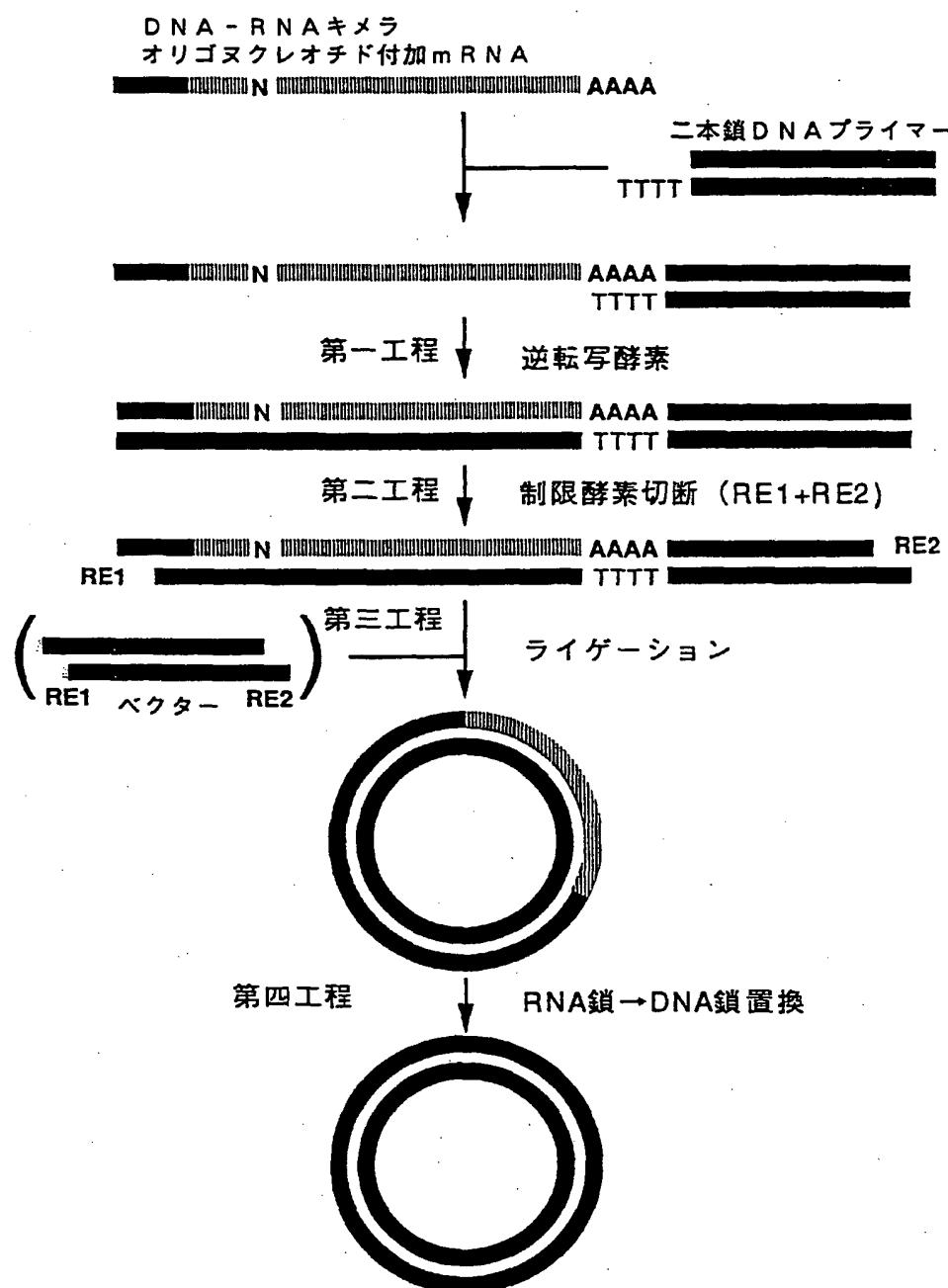


図 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C15 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C15 C12N15/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gene, Vol. 68, 1988, Rutledge RG et. al. "Rapid synthesis and cloning of complementary DNA from any RNA molecule into plasmid and phage M13 vectors" p. 151-158	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search

December 21, 1993 (21. 12. 93)

Date of mailing of the international search report

February 8, 1994 (08. 02. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 93/01359

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL^a C12N15/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL^a C12N15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Gene, 第68巻, 1988, Rutledge R G et al. [Rapid synthesis and cloning of complementary DNA from any RNA molecule into plasmid and phage M13 vectors] p.151-158	1-7

 C欄の続きを参照。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の
 後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
 に引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
 性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
 がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.12.93

国際調査報告の発送日

08.02.94

名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

佐藤雪枝

④

4 B 9 0 5 0

電話番号 03-3581-1101 内線 3448